

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-245097

(P2003-245097A)

(43)公開日 平成15年9月2日(2003.9.2)

(51)Int.Cl.  
C 12 Q 1/68  
// C 12 N 15/00  
15/09

識別記号  
ZNA

F I  
C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/00

コード\*(参考)  
ZNA A 4 B 0 2 4  
A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L 外国語出願 (全 70 頁)

(21)出願番号 特願2002-300727(P2002-300727)  
(22)出願日 平成14年10月15日(2002.10.15)  
(31)優先権主張番号 3 3 7 8 5 6  
(32)優先日 平成13年11月8日(2001.11.8)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 590003065  
ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノート  
シャープ  
オランダ国ロッテルダム、ヴェーナ 455  
(72)発明者 スザンナ・テクリツツ・イオブスト  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・  
07020、エツジウォーター、リバー・ロー  
ド・45、ユニリーバー・リサーチ・ユー・  
エス・インコーポレイテッド  
(74)代理人 100062007  
弁理士 川口 義雄 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】光障害を分析するための遺伝子発現

(57)【要約】 (修正有)

【課題】光傷害を検出する肌のパーソナルケア方法を提供する。

【解決手段】既知の肌状態を有する皮膚サンプルの第1の遺伝子発現と既知の肌状態を有していない皮膚サンプルの第2の遺伝子発現を測定する。複数の光傷害のマーカーを使用し、遺伝子の発現を比較・評価する。光傷害マーカーとしてのポリヌクレオチド配列に提供される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 光障害を検出するパーソナルケア方法であって、(a)配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、および配列番号69からなる群から選択される1つまたは複数の配列から選択される、少なくとも1種の光障害のマーカーを使用するステップと、(b)該マーカー中の変化を検出して、光障害の存在を決定するステップを含む方法。

【請求項2】 検出ステップ(b)が、(b1)第1の皮膚サンプルを、第2の皮膚サンプルと比較して、マーカー中に変化があるかどうか決定するステップをさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】 表皮もしくは真皮または皮膚全体のサンプルにおける肌状態を測定するためのパーソナルケア方法であって、(a)既知の肌状態を有する所定の皮膚サンプルの第1の遺伝子発現を測定するステップと、

(b)既知の肌状態を有していない所定の皮膚サンプルの第2の遺伝子発現を測定するステップと、(c)第1の遺伝子発現と第2の遺伝子発現の変化の、既知の肌状態を特定する複数のマーカーを同定するステップを含む方法。

【請求項4】 同定ステップ(c)が、(c1)第1の遺伝子発現と第2の遺伝子発現の間の遺伝子発現の変化を評価することによって、マーカーを決定するステップをさらに含む請求項3に記載の方法。

【請求項5】 既知の肌状態が、光障害、老化、乾燥肌、および脂性肌を含む状態から選択される請求項3に記載の方法。

【請求項6】 既知の肌状態が光障害であり、複数のマーカーが、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、および配列番号69からなる群から選択される請求項3に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子アレイにおける、光障害のマーカーとして機能するポリヌクレオチド配列、およびこれらのマーカーを使用して光障害を検出する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】本出願は、2001年11月8日に出願され、参照によって本明細書に組み込む米国仮出願第60/337,856号の優先権を、米国特許法第119

条に基づいて主張する。

【0003】細胞の全遺伝子がゲノムを構成する。ヒトゲノムは、約40,000の遺伝子を含んでいる。しかし、所与のいずれの細胞においても、発現する、あるいはその結果が表現型に現れるのは、これらの遺伝子のほんの一部だけである。表現型とは、遺伝子型と環境との相互作用によって生じる、生物の、目に見える特性を意味する。したがって、各細胞型において、どの瞬間にでも発現しているのはヒトゲノムのほんの一部だけである。

10 それぞれの遺伝子が発現する時期は正確であり、レベルも正確である。

【0004】自動DNAシーケンサーにより、生物のゲノムの配列の決定が容易になった。例えば、*Haemophilus influenzae*、*Mycoplasma genitalium*、および*Caenorhabditis elegans*のゲノム配列が発表されており、それによってヒトなどのより高等な生物のゲノム配列が得られる可能性がもたらされている(F. E. Ischmann, R. D. et al. (1995) *Science* 269:496; Fraser, C. M. et al. (1995) *Science* 270:397; Hodgkin, J. et al. (1995) *Science* 270:410)。

20 【0005】所与の系列の通常の哺乳類の細胞は、そのゲノムに含まれる40,000余りの生殖系列遺伝子のうち約20,000~30,000を発現している。ほとんどすべての細胞は、多くの遺伝子を普遍的に発現し、これらは「ハウスキーピング」遺伝子と呼ばれる。ハウスキーピング遺伝子の例には、解糖に関与する酵素、または細胞構造に関与するタンパク質をコードする遺伝子がある。しかし、細胞を分化させるのは、非普遍的に発現する遺伝子である。細胞が分化細胞に成熟するにつれて、非恒常に発現するある種の遺伝子が、異なる段階で、オンになったりオフになったりする。したがって、細胞間の遺伝子発現パターンの違いにより、例えば神経細胞が、血液細胞と違ったものになる。

30 【0006】疾患または障害のある個体の状態のような、異常細胞の状態では、個々の細胞内の遺伝子発現のパターンは、正常な非疾患状態で見られる発現パターンと比較して変化している可能性がある。遺伝子発現の変化は、例えば腫瘍細胞中などにおいて、疾患または異常の結果あるいは原因である可能性がある。ある種の疾患は、特定の遺伝子の変異によって引き起こされると理解されているので、そのゲノム配列を調べることによって潜在的に検出できる可能性があるが、多くの疾患および障害は、遺伝子の発現レベルにおける機能不全を伴い、ゲノムの配列決定によって検出することはできず、細胞の遺伝子発現パターンを同定することによってのみ検出することができる。したがって、ある生物中の(その生涯の特定の時期での)特定の細胞型の機能を理解するた

めに、あるいは疾患または障害の進行状況を理解するために、その生物の発達の異なる段階でのこうした特定の細胞型内の個々の遺伝子の発現状態を理解することが必要である。

【0007】肌の老化は、同時に起こる2つのプロセスからなると考えられている。第1のプロセスは、内因性の、経時的老化であり、他の組織の老化とおそらく同様のものである(Uitto, 1986)。第2のプロセスは、光老化、すなわち、皮膚が太陽光に繰り返し曝される結果起こる、環境によって引き起こされる真皮のリモデリングである。最近の研究では(Varani他, 1998; Varani他, 2000)、内因性の老化も光老化も、プロコラーゲン遺伝子発現の減少や、いくつかのマトリックスメタロプロテイナーゼをコードする遺伝子の発現の増加などのある種の共通の特性を有することが示されており、光老化は、日光に曝された肌の外観の早期老化(prematurely aged)に寄与する主な要因であることが示唆されている(YaarおよびGilchrest, 1998)。

【0008】臨床的には、日光により障害を受けた肌は、しわ、弾力性の喪失、およびきめの変化が特徴である(Kligman, 1989; Taylor他, 1990)。組織病理学的な分析により、日光に曝された肌の真皮内の様々な細胞外マトリックスタンパク質の変性が明らかになったので、以前の研究では、これらの特徴は主に、真皮の変化に帰するとされた。こうした真皮の変化のうちもっとも顕著なものは、日光に曝された肌の真皮の表層(superficial dermis)に明らかに形態変化した弾性線維が著しく蓄積することである。日光への曝露に統いて起こる、異常な真皮弾性線維のこの蓄積は、日光性弾力線維症(solar elastosis)と呼ばれている(Gilchrest, 1989)。

【0009】日光性弾力線維症をもたらす細胞の機構は理解されておらず、それどころか、日光性弾力線維症の間の弾性線維の合成に関しては、異論の多い知見が報告されている。いくつかの報告では、日光性弾力線維症の間に蓄積した弾性線維は、通常の弾性線維と同じ成分からなり、これは、エラスチン(弾性線維の無定形成分を構成する、架橋した不溶性タンパク質)、およびフィブリリン、すなわち弾性線維のミクロフィブリルの主な成分を含むことが報告されている。ケラチノサイトは、UVAおよび/またはUVB放射線に応答して、線維芽細胞合成活性を刺激することができる多くのメディエーターを分泌し、それらのうちのいくつか、例えばTGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、およびIL-10は、エラスチン遺伝子のプロモーター活性、定常状態のmRNAレベル、および増加したエラスチンの蓄積を増すことが示されている(Kahari他, 1992; Mauviel他, 1993; Reitamo他, 1994)。Bernst

ein他(1994)が日光により障害を受けた肌においてエラスチンmRNAレベルが増加することを報告しているが、Werth他(Werth他, 1997)は、日光性弾力線維症の間のエラスチンmRNAの定常状態レベルに差がないことを報告している。後者の発見は、転写後の機構により、mRNAレベルが上昇することなく、紫外線照射に応答して、エラスチン蓄積の原因である翻訳効率の増進がもたらされることを示唆する(Schwartz他, 1995)以前の研究に一致している。これらの結果は、UVへの曝露の結果としての、弾性線維を構成するタンパク質をコードする遺伝子の異常な発現が、日光性弾力線維症の基盤である可能性があることを意味する。さらに、いくつかの報告では、エラスチンだけでなくフィブリリンの定常状態のmRNAレベルの変化が実証されている(Bernstein他, 1994)。追加の観察ではまた、リシルオキシダーゼ、すなわちエラスチン架橋の触媒作用の原因である銅依存型アミンオキシダーゼなど弾性線維タンパク質のレベルの変化にも言及されている(Smith-MungoおよびKagan, 1998)。

【0010】細胞外マトリックスタンパク質の、UV照射に応答する他の変化も実証されている。例えば、コラーゲン原線維の量は、光老化肌では、劇的に減少することが示されている。この変化は、コラーゲンmRNAレベルの変化に伴うのではなく、コラーゲン原線維の分解は、UVへの曝露に伴うことが示唆されている(Bernstein他, 1996)。コラーゲン沈着におけるこうした変化を説明するために、Voorhees他は、UV照射が、成長因子の増加、ならびに線維芽細胞およびケラチノサイトにおけるサイトカイン受容体合成を誘導することを提案している。この受容体合成の増大により、統いて、MAPキナーゼ(マイトジエン活性化プロテインキナーゼ)シグナル伝達カスケードを通して、転写因子AP-1が活性化され(Fisher他, 1996; FisherおよびVoorhees, 1998)、コラーゲンを分解するいくつかのマトリックスメタロプロテイナーゼをコードする遺伝子の発現が上昇し(Fisher他, 1996)、I型およびII型プロコラーゲンをコードする遺伝子の発現が低下する。

【0011】マトリックスメタロプロテイナーゼ遺伝子発現の、AP-1活性化についてのこのモデルは、魅力的な仮説ではあるが、UVへの曝露に伴うことが示されている細胞外マトリックスの他の多くの変化を説明するものではない。さらに、日光により障害を受けた肌の病理生物学は、真皮および表皮における遺伝子発現の、複数の直接的変化と間接的変化(AP-1活性化はこうした変化の一例にすぎない)の複雑な相互作用を通して現れる可能性が高い。

【0012】日光による障害に関連する事象の複雑なカスケードは、あまり分かっていない。日光への曝露に応

答する転写産物のプロファイルの変化を特定するために、研究者らは、例えば様々な細胞からタンパク質を単離し、それらのタンパク質のそれぞれの存在量を比較する技術など、多くの技術を使用してきた。別的方法は、mRNAプールから產生されたペプチド集団を探るための抗体を使用するものである。したがって、米国特許第5,242,798号に記載されているように、mRNA分子によってコードされたポリペプチドに相当する合成ポリペプチドの「ライブラリ」を作製し、次いで個々の抗体で探索する。

【0013】所与の組織または細胞によってどの遺伝子が発現するかの決定において行われた進歩に平行して、遺伝子の「アレイ」技術の設計および製造が、バイオテクノロジー業界で、大きく進歩した。SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)などの技術を使用して、ケラチノサイト（または表皮）でのデータを作成し、それによって遺伝子アレイを開発することができる。

【0014】遺伝子アレイは、（機能が分かっているあるいは分かっていない）数1000個までの問題の個々の遺伝子を表す、固定されたヌクレオチド配列を含む固相系である。このようなアレイを利用して、組織または細胞培養物の抽出物を試験し、治療、傷害、年齢、性別、民族、薬物、食物、および化粧品に応答して、どの遺伝子がオンまたはオフであるか決定することができる。しかし、従来技術で利用できるこの方法では、依然として、実験モデルにおいて、またはヒトの組織において、少数の遺伝子の発現さえ追跡することが困難である。

【0015】いくつかの特許は、SAGE技術の使用に、あるいはアレイの作製に関係し、アレイを作製し、加工するために設計された器具を保護している。例えば、EP799897は、プローブアレイ中のタグ核酸を選択するための方法および組成物を開示している。WO9743450は、オリゴヌクレオチドアレイ上のハイブリダイゼーションアッセイを開示している。WO9815651は、アンチセンスオリゴヌクレオチド結合を同定するための方法を開示している。しかし、知られている特許はどれも、光障害の識別のための特定の遺伝子アレイの構成および使用を開示していない。

【0016】本明細書では、用語「備える (comprising)」は、含む、構成される (made up of)、構成される (composed of)、からなる、および／または本質的にからなるを意味する。実施例および比較例中を除いて、あるいは別段の明確な指示がなければ、この説明中の、材料または反応の条件、材料の物理的性質、および／または使用の量または比を示すすべての数は、「約」という語で修飾されることを理解されたい。

【0017】本明細書では、「皮膚」という用語は、

顔、首、胸、背中、腕、手、脚、および頭皮の皮膚を含む。「表皮」または「ケラチノサイト」という用語は、用語「皮膚」に含まれるのと同じであると考えられる。

#### 【0018】

【非特許文献1】Fleischmann, R. D. et al. (1995) Science 269:496

【非特許文献2】Fraser, C. M. et al. (1995) Science 270:397

【非特許文献3】Hodgkin, J. et al. (1995) Science 270:410

【特許文献1】米国特許第5,242,798号

【特許文献2】EP799897

【特許文献3】WO9743450

【特許文献4】WO9815651

【特許文献5】米国特許第5,695,937号

#### 【0019】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、遺伝子アレイにおける、光障害のマーカーとして機能するポリヌクレオチド配列、およびこれらのマーカーを使用して光障害を検出する方法に関する。

#### 【0020】

【課題を解決するための手段】光障害を検出するパーソナルケア方法であって、(a) 配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、および配列番号69からなる群から選択される1つまたは複数の配列から選択される、少なくとも1種の光障害のマーカーを使用するステップと、(b) 該マーカー中の変化を検出して、光障害の存在を決定するステップを含む方法。

#### 【0021】

【発明の実施の形態】本明細書では、これから説明する用語は、以下の通りであると理解されたい。

【0022】「医療用適用物 (Medical Application)」は、処方箋によってのみ配布される、あるいは医療専門職にのみ配布される装置および組成物である。

【0023】「パーソナルケア適用物」は、ヒトの皮膚の清浄化およびケアのための、医療用適用物以外の装置および組成物である。

【0024】「遺伝子」は、ヒトの染色体中に見られる遺伝する (inheritable) 遺伝物質の単位である。

【0025】すべての核酸の繰り返し構成単位は、8つの異なるヌクレオチドであり、ヌクレオチドのうち4種は、DNAの構成単位であり、他の4種は、RNAの構成単位である。例えば、DNAの4文字の語は、タンパク質の20文字の語に翻訳される。

【0026】「オリゴヌクレオチド」は、2つ以上、好ましくは3つより多いデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドからなるオリゴマー断片である。

【0027】「ポリヌクレオチド配列」は、モノヌクレオチドの所与の順序のポリマー鎖である。ポリヌクレオチド配列は、5'～3'末端、またはその相補鎖である3'～5'が報告されている。

【0028】「発現配列タグ」（「EST」）は、例えばcDNA（相補的デオキシリボ核酸）配列を特異的に指定するものなど、十分な数の塩基対を含むヌクレオチド配列である。ESTは、単離することも精製することもできる。

【0029】「単離された」は、他の細胞成分から分離された核酸を意味する。

【0030】「精製された」は、核酸のみを残すようになりますだけ他の材料を取り除いた単離された核酸混合物を意味する。

【0031】遺伝子発現分析法は、光障害または乾燥肌などの特定の肌状態を示すマーカーを同定するために利用できる手段である。光障害、乾燥肌、脂性肌、および他の「美容上の」肌状態は、生物学的にあまり理解されていない。旧来、これらの状態は、一時に1つの生物学的内経路に取り組むことによって研究されている。本発明は、肌状態を包括的に研究し、新規の経路を解明するために、以下により詳細に説明するSAGE技術の適用を提供する。本発明は、特定の肌状態を示すものであるポリヌクレオチド配列を提供する。具体的には、本発明は、光障害において変化し、したがって光障害のマーカーとして使用できる特異的な「EST」（遺伝子のセット）を提供する。本発明のESTすなわちマーカーが、光障害を確認するために重要である、あるいは使用されることとは、以前には全く知られていなかった。

【0032】ポリヌクレオチド配列を同定する好ましい方法は、米国特許第5,695,937号に記載されているように、SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) を使用することによるものである。この技術により、多数の転写産物の分析が可能になる。本質的には、cDNAオリゴヌクレオチドを生成する。次いで、第1の定義されたヌクレオチド配列タグを、第1のcDNAオリゴヌクレオチドから単離し、第2の定義されたヌクレオチド配列タグを、第2のcDNAオリゴヌクレオチドから単離する。第1のタグおよび第2のタグのヌクレオチド配列を決定すると、これらのタグは、発見した遺伝子に対応する。

【0033】本発明は、光障害を確認するためのEST、およびそれがコードするタンパク質を使用する方法を提供する。この方法は、少なくとも1つの配列を有する第1の表皮サンプルを選択し、同じ配列を有する第2の表皮サンプルを選択する第1のステップを含む。第1の表皮サンプルを第2の表皮サンプルと比較して、配列

に変化があるかどうか判定する。配列に変化があった場合、第2の表皮サンプルには光障害が存在する。同じ方法を、真皮または皮膚全体のサンプルにも適用できる。

【0034】耳介後部の皮膚と耳介前部の皮膚のSAGEライブラリの比較

日光に曝された肌で特異的に発現する遺伝子を同定するため、耳介前部の皮膚と耳介後部の皮膚についてSAGEライブラリを比較した。分析されたSAGE配列タグの、小さいが重要な分画が、耳介前部の皮膚と耳介後部の皮膚のコピー数について、著しい差を示した。日光に曝された耳介前部の皮膚では、19個の特異的なタグが、(少なくとも4分の1の)かなり低レベルで見られたのに対し、耳介前部の皮膚では、15個が、少なくとも4倍高いレベルで見られた。表4および表5は、こうしたコピー数が著しく異なるタグを列挙する。これらのタグのうち、24個は、UniGeneデータベースに特異的に適合し、10個のタグは、多重適合する、あるいは適合しなかった。これらの適合しなかったタグのうち3個は、主として複数のデオキシアデノシン残基からなる配列をもつ：表I中のタグ配列番号51(CAAA AAAA)およびタグ配列番号65(GGAAA AAAA)、表II中のタグ配列番号77(TAA AAAA)。別の4個のタグは、2個の異なる遺伝子に信頼度の高い適合をし、1個のタグは、いずれの指向型(oriented)GenBank cDNA配列とも著しい類似性は示さなかつたが他のSAGEライブラリ中には見られ、1個のタグは、UniGeneまたは他のいずれのSAGEライブラリに対しても適合しなかつた。残りの同定されていないタグは、Alu反復配列を表し、その結果多数の適合がもたらされた。

【0035】特異的に適合した24個のタグのうち、耳介前部の皮膚では、ケラチン1タグの数が7倍多いことが観察された。また、日光により障害を受けた肌におけるいくつかの他の遺伝子(表II)から誘導されたタグについてコピー数が増加していることを発見した。これらには次のものが含まれる。

【0036】1.psoriasis遺伝子は、S100カルシウム結合タンパク質ファミリーのメンバーをコードし、この遺伝子から誘導されたタグは、耳介前部の皮膚では4倍高いレベルであることが判明した。Psoriasisタンパク質およびmRNAレベルは、in vivoのUVBに曝された肌において、曝露後10日まで上昇することが報告されている(Di Nuzzo他、2000)。さらに、Psoriasisは、乾癬症の表皮のすべての層に存在することが以前に示されており、表皮の脂肪酸結合タンパク質(EFABP)に関連することが示されており、Psoriasisをコードする遺伝子も、EFABPをコードする遺伝子も、乾癬症において上方制御されることが知られている(Hagens他、1999)。EFABP遺伝子発現はま

50

た、ヒトの皮膚において、レチノイン酸の局所適用によって誘発されることも示されている (Larsen他、1994年)。本発明のSAGEデータでは、日光に曝された肌では、通常の皮膚に比べて、EFABP mRNAについて6倍多いタグ数が示された。

【0037】2. インシュリン様成長因子結合タンパク質6 (IGFBP-6) をコードするmRNAは、耳介前部の皮膚では6個のタグによって、耳介後部の皮膚では1個のタグによって表され、IGFBP-6は、インシュリン様成長因子II (IGF-II) と高い親和性で結合し、この結合は、IGF-IIの作用を抑制する。IGFBPプロテアーゼのうち3グループ (マトリックスマタロプロテイナーゼ、カリクレイン、およびカテプシン) は、IGFBP-IGF複合体を切断し、また、その結合タンパク質から、機能的なIGFを放出することが示されている。IGFBP-6は、静止状態の非増殖性細胞と関連していたが、これは、IGFBP-6が、自己分泌型 (autocrine) 成長因子として作用することを示唆している (Kato他、1995)。Kelleley他 (Kelleley他、1996) は、IGFBPが、IGFとは無関係に、追加の固有の生物活性も有することを示唆している。

【0038】3. カルモジュリン様皮膚タンパク質 (CLSP) に対するmRNAは、日光により障害を受けた肌と日光から保護された肌でタグ比16:4で表される。CLSPは、最近同定されたタンパク質であり、特に表皮に豊富であることが報告されている。さらに、CLSP遺伝子発現は、ケラチノサイト分化と直接的に関連することが示されている (Mehul他、2000)。

【0039】4. マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) mRNAは、耳介前部の皮膚では4倍に上方制御された。活性化T細胞によって放出されることがもともと報告されていたMIFは、マクロファージの遊走を阻止し、炎症部位でマクロファージを活性化させる。さらに、以前の研究では、MIFを、表皮の免疫および細胞分化における制御因子として関係づけている (Shimizu他、1995)。UVB照射は、in vivo およびin vitroで、ヒトの表皮のケラチノサイトにおけるMIF産生を誘発することが示されている (Shimizu他、1999)。さらに、乾癬症のプラークにおいてMIFレベルが上昇するので、MIFはまた、乾癬症に関与するととも考えられている (Steinhoff他、1999)。したがって、MIFは、いくつかの炎症誘発性のサイトカインを調整すること、かつ免疫細胞の活性化およびサイトカインの産生に対するステロイドの免疫抑制効果を制御することによって、抗炎症作用の阻害物質として機能していると思われる。

【0040】5. 本発明の耳介前部の皮膚ライブリにおいて、精巣増強遺伝子 (Testis enhanc-

ed gene) 転写産物 (TEGT) に対する4個のSAGEタグが同定されたのに対し、すべての耳介後部のタグ中では、1個のタグのみが、検出された。TEGTは、前アポトーシス (proto-apoptotic) タンパク質baxの最近記載されたリプレッサーであるbaxインヒビター1 (BI-1) に一致することが判明している (XuおよびReed、1998)。アポトーシス抑制の機構は未だ明確にされていないが、BI-1が、baxのレベルに対してそれほど影響を与えないことが示されている。したがって、BI-1は、baxを間接的に、おそらく抗アポトシスタンパク質bcI-2の代わりに用いることによって抑制することが示唆された。

【0041】6. 耳介前部の皮膚では、セルギリン (cellugyrin) mRNAを表すタグの数が、4倍に増加した。セルギリンは、シナプトギリン (synaptogyrin) のシナプス小胞タンパク質ファミリーの一、広範に発現するメンバーであり、シナプス小胞輸送の調節に不可欠である (JanzおよびSudhof、1998)。例えば、脂肪細胞では、インシュリンは、細胞内区画から原形質膜への、グルコーストランスポーター4 (Glut4) を含有する膜小胞の移動を活性化し、最終的に、グルコースの取り込みを増大させる。セルギリン陽性Glut4小胞の原形質膜への再分配は、インシュリンの刺激では開始しないので、これらの小胞は、原形質膜に移動するGlut4小胞とは無関係に、特異的な機能特性を有していると考えられる (KupriyanovaおよびKandror、2000)。

【0042】7. イモゲン (imogen) 38 (ミトコンドリア38kD島 (islet) 抗原) に対するmRNAも、耳介前部の皮膚においてタグ数が4倍に増加することによって表される。この抗原は、I型糖尿病 (インシュリン依存性糖尿病) における自己反応性T細胞の分子標的の1つである。

【0043】日光に曝された肌における、知られているタンパク質をコードするmRNAからの、数が減少したタグ (表I) には、次のものが含まれる。

【0044】1. カテプシンD (配列番号55) は、耳介前部の皮膚において、mRNAの定常状態レベルが最も著しく低下 (5分の1未満) することが示された。カテプシンDは、表皮ならびに他の多くの組織に存在することが知られているリソソームのアスパラギン酸プロテイナーゼである。このタンパク質の活性化および分解の時期は、細胞分化の段階と関係することが示されており、また、表皮におけるカテプシンDの発現は、ケラチン10、インボルクリン、およびトランスクレタミナーゼなど、カルシウム濃度の変化に応答する他の構造タンパク質の発現に似ている (Horikoshi他、1998)。

【0045】2. 耳介後部ライプラリに比べて、本発明者らの耳介前部ライプラリにおいて、代表的なSAGEタグが5分の1に減少していることが示されたラジニン(Ladinin)mRNA(下の表I中の配列番号56)は、係留細線維(anchor ing-filament)関連タンパク質であり、線状IgA疾患などの自己免疫異常に寄与するいくつかの基底(base ment)関連タンパク質の1つである(MoilおよびMoll、1998)。

【0046】3. 下の表I中の配列番号57は、耳介後部の皮膚では9倍、耳介前部の皮膚ではわずか2倍であることが判明した。このタグは、2つの異なるUnigeneデータベースエントリー、すなわちレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)をコードするmRNAに対するものと、Bcl-2-アンタゴニスト(Bak)をコードするmRNAに対する第2のエントリーに適合していた。LCATは、コレステロールをコレステリルエステルに転換し、また、血中のコレステロールの恒常性を保つ際の重要な酵素である。感染症または炎症により、リポタンパク質代謝、ならびに脂質およびリポタンパク質の血漿濃度が搅乱され、また、LCATは、こうした条件下で変化することが知られている(Khovidhunkit他、2000)。一方、Bakは、baxと高い配列相同意を有する前アポトーシスタンパク質である。どちらのタンパク質も、ミトコンドリア膜でオリゴマー化し、チトクロムcを容易に流出する孔を形成し(Korsmeyer他、2000)、アポトーシスカスケードを誘発すると考えられている。

【0047】4. 日光により障害を受けた肌では、ジキシン(zyxin)をコードするmRNAについて、通常の肌に比べて4分の1のmRNAレベルが検出された。ジキシンは、表皮のすべての層で発現することが報告されている(Leccia他、1999年)局所接着性リンタンパク質である。さらに、ジキシンはまた、タンパク質が、細胞-基層間接着性結合部(adherens junction)とも細胞-細胞間接着性結合部とも共存していることが示されている線維芽細胞にもみられる。ジキシンは、(LIMドメイン、二重の(d

ouble) Znフィンガーモチーフなどの)構造的特性を、発生調節に関与するシグナルransデューサーと共に有しており、以前の研究では、ジキシンはまた、細胞の増殖および分化の調節に関与する可能性もあることが示唆されている(Beckerle、1997)。

【0048】5. 日光により障害を受けた肌から誘導されたSAGEライプラリでは、カルシウムイオン結合タンパク質S100A3をコードするmRNAのレベルは低下していることが示された。Psoriasisと同じように、S100A3は、S100カルシウム結合遺伝子ファミリーのメンバーである。S100A3をコードする遺伝子の、マウスにおける著しい発現は、毛囊に限られ、この遺伝子の発現のタイミングは、ヘア成長サイクルの新生(neonatal)期および成長(adolescent)期と同時期である(Kizawa他、1998)。

【0049】6. 軟骨基質オリゴマータンパク質(cartilage oligomeric matrix protein)(COMP)と呼ばれる別のCa<sup>2+</sup>結合タンパク質について、日光に曝された肌におけるタグ数の減少が観察された。COMPは、軟骨および靭帯中だけでなく、in vitroのヒトの真皮の線維芽細胞(Dodge他、1998)およびヒトの血管平滑筋培養細胞(Riessen他、2001)中でも発現する細胞外マトリックス糖タンパク質である。COMPにおける変異は、カルシウム結合能力を低下させ、最終的に骨格の障害である偽性軟骨無形成症(PSACH)をもたらすことが示されている(Maddox他、2000)。しかし、他の点では、COMPの機能について知られていることは非常に少ない。

【0050】日光に曝された耳介前部の皮膚では、リボソームRNAから誘導されたタグ(ACATCATCGAT-配列番号53およびACTCCAAAAAA-配列番号54)、ならびに知られていないタンパク質をコードするmRNAから誘導されたタグ(CAAAAAAAAAA-配列番号51およびACGTTAAAGA-配列番号52)の数の減少が観察された。

【0051】

【表1】

表Ⅰ：耳介前部の皮膚で下方制御された遺伝子

配列番号	タグ配列 <sup>a</sup>	後部	前部	後部/前部	UniGeneとの適合 <sup>b</sup> (受託番号) <sup>c</sup>
51	CAAAAAAAA	7	1	7.0	多重適合
52	ACGTTAAAGA	6	1	6.0	指向型GenBank cDNA配列中に見られなかったタグ
53	ACATCATCGAT	5	1	5.0	リボソームタンパク質L12 (L06505)
54	ACTCCAAAAAA	5	1	5.0	リボソームタンパク質S15 (AA079663)/ IMAGEクローン3840457 (BC012990)
55	GAAATACAGTT	5	1	5.0	カテプシンD (M11233)
56	GCCAGGAGCTA	5	1	5.0	ラシニン1/EST、ATIC (J42408/AI214479) と高度に類似
57	CTCCTCACCTG	9	2	4.5	BCL2-アンタゴニスト (J16811) リボソームタンパク質L13A (NM021423)
58	CAATAAACTGA	4	1	4.0	推定上翻訳開始因子 (AA009621)
59	CAGCTCACTGA	4	1	4.0	リボソームタンパク質L14 (D87735)
60	CAGGACCTGGT	4	1	4.0	指向型GenBank cDNA配列中に見られなかったタグ
61	CCCAAACGCGCT	4	1	4.0	ヘモグロビンα1およびα2 (J00153)
62	CCCTGGCAATG	4	1	4.0	特徴付けられていない造血幹/前駆細胞タンパク質MDS027 (AI161418)
63	CTGCCAACAGTTG	4	1	4.0	ジキシン (U15158)
64	GCAAAACCCCG	4	1	4.0	多重適合

65	GGAAAAAAA	4	1	4.0	多重適合
66	GGGGCAGGGCC	4	1	4.0	真核生物翻訳開始因子5A (AW505485)
67	GTGCACTGAGC	4	1	4.0	主要組織適合複合体、クラスIAおよびIC (M11887; M11886)
68	TCTCCCACACC	4	1	4.0	カルシウム結合タンパク質S100 A3 (N002960)
69	CGGGGTGGCG	4	0	4.0	軟骨基質オリゴマータンパク質 (L32137)

a タグは、後部/前部の比で示される通りの、下方制御の倍率順に並べてある。

b 1つまたは複数の受託番号は、対応するUniGeneクラスターから誘導された代表的なESTを示す。

受託番号がない場合は、多重適合またはEST適合するタグを示している。

c 0による除法を避けるため、少しも検出されなかったタグについてはタグ値1を使用した。

表II：耳介前部の皮膚で上方制御された遺伝子

配列番号	タグ配列 <sup>a</sup>	前部	後部	前部/後部	UniGeneとの適合 <sup>b</sup> (受託番号) <sup>c</sup>
70	ACATTTCAAAG	7	1	7.0	ケラチン1 (AA024512)
71	CAGCTATTCA	6	1	6.0	脂肪酸結合タンパク質5 (AF181449)
72	GGCCCTTCACC	6	1	6.0	インシュリン様成長因子結合タンパク質6 (M69054)
73	ATCCGCGAGGC	16	4	4.0	カルモジュリン様皮膚タンパク質 (AF172852)
74	AACGCGGCCAA	8	2	4.0	マクロファージ遊走阻止因子 (L10612)
75	GAGCAGCGCCC	8	2	4.0	S100カルシウム結合タンパク質 A7 (Psoriasin1) (M86757)
76	AAGAAGATAGA	4	1	4.0	リボソームタンパク質L23a (J43701)
77	TAAAAAAAAAAA	4	1	4.0	多重適合
78	TCAGACTTTTG	4	1	4.0	シアシルグリセロールO-アシルトランスフェラーゼ (NM032564)
79	TTGGTGAAAGGA	4	1	4.0	$\beta$ 4チモシン (M17733)
80	AACTAACAAAA	4	0	4.0	リボソームタンパク質S27a (X63237)
81	CAATAAATGTT	4	0	4.0	リボソームタンパク質L37 (D23661)
82	GCTCCCAGACT	4	0	4.0	シナプトギリン2 (AJ002308)
83	GGAAGTTTCGA	4	0	4.0	ミトコンドリアリボソームタンパク質64 (AB049959)
84	TCAAAAATATA	4	0	4.0	ミトコンドリアリボソームタンパク質S31 (NM005830)

a タグは、前部/後部の比で示される通りの、上方制御の倍率順に並べてある。

b、cは、表Iに対する説明で述べた通りである。

### 【0053】実施例 1

繰り返し日光に曝されたヒトの肌において、表現型の変化をトランスクリプトームレベルで研究するため、日光により障害を受けた耳介前部の皮膚と日光から保護された耳介後部の皮膚、ならびに日光から保護された表皮の比較Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)を行った。複数のmRNAから誘導されたタグ組換え体を含むSAGEライブラリを、ヒトの耳介後部の皮膚および耳介前部の皮膚、ならびに表皮のニック (nick) 生検サンプルから単離されたポリA (+) RNAに対して作製した。耳介後部のSAGEライブラリから得たmRNAから誘導された5,330個のcDNAタグの配列を決定し、これらのタグ配列を、耳介前部のSAGEライブラリから得た、分析された5,105個のタグから同定されたcDNA配列と比較した。両方のライブラリで表された、合計で4,742個の異なるタグのうち、ライブラリ間

のタグの存在量が少なくとも4倍異なる35個のタグを発見した。日光により障害を受けた肌において定常状態レベルが変化したmRNAの中で、ケラチン1、マクロファージ抑制因子、およびカルモジュリン様皮膚タンパク質をコードするものを検出した。さらに、表皮の生検サンプル (5,257個のcDNAタグ) から得られたSAGEライブラリ中で同定されたcDNA配列と、全層 (full-thickness) の皮膚サンプルから得られたSAGEライブラリ中で同定されたcDNA配列の両方を比較すると、日光への曝露後、表皮のケラチノサイトで、定常状態の転写産物レベルが変化した多数の遺伝子が発現することが示された。この結果は、慢性的に日光に曝された肌での真皮の大きな変化の疾患機構 (pathomechanism) における、表皮の主要な役割を示唆している。

### 【0054】遺伝子アレイの確立

50 タグの配列決定のプロトコル：ABI Prism 3

10 Genetic Analyzer, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Shelton, CTを使用して、得られたジタグコンカテマーの配列分析を行った。このシステムは、DNA断片の塩基配列、またはサイズおよび量を決定することができる自動装置である。これは、ポリアクリルアミドキヤピラリー電気泳動を多色蛍光DNA検出法と組み合わせて使用するものである。

【0055】使用するBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Cat. #403044) Analyzer, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Shelton, CTは、いわゆるサーマルサイクル塩基配列決定法、すなわちサンガーの蛍光ジデオキシ塩基配列決定法の手順を、DNA鑄型のリニア增幅法と併用する方法に頼っている。

【0056】配列決定反応1回につき、典型的な例として、鎖状体ーインサートサイズチェックPCR試薬 (concatamer-insert-size-check PCR reaction) 1 $\mu$ l (約100ng) を、Ready reaction Mix (AmpliTaq FS、シーケンシングバッファー (sequencing buffer)、および蛍光標識したddNTP) 4 $\mu$ l、M13 Reverse primer 3.2 pmol、およびddH<sub>2</sub>O 11 $\mu$ l を含む200 $\mu$ l PCR管に加えた。この溶液を混合し、ABI GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Shelton, CTで、次の条件でサイクル塩基配列決定反応を行った：25サイクル (96°Cで10秒間、55°Cで5秒間、60°Cで4分間)。

【0057】3M 酢酸ナトリウム2 $\mu$ lと、95%エタノール50 $\mu$ lを管に加えることによって、得られた伸長した生成物を精製した。少なくとも15分沈殿させた後、この混合物を20分間最高速度で回転させ、上清を注意深く吸引し、残ったペレットを70%エタノールで2回洗浄した。このペレットを乾燥させ、Temp l

ate Suppression reagent (PE Cat. #401674) 20 $\mu$ lに再び溶解させた。最高で96本のこれらの管をまとめて、ABI Prism 310 Genetic Analyzerに装入した。

#### 【0058】タグの遺伝子への転換

SAGEタグを構成する10~11塩基対を、NCBI SAGEデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>) と比較した。遺伝子地図に対するタグのオプションを選択した。これにより、このタグに適合するUniGene クラスターが同定された。このIDに適合する配列も同定された。次いで、このタグを含む個々の配列を、NCBIから抽出し、Multiple Sequence Alignmentが完了した。次いで、最も長いクローニングを逆転写させると、タンパク質の推定上の一次構造が明らかになった。

【0059】ノーザンプロット分析：SAGEによって示された光障害における発現変化を確認するため、3つの異なるメッセージを使用して、確認用 (confirmatory) ノーザンプロットを行った。これを下の表Aに示す。これらは、SAGEによって決定された関係に十分に一致している。ケラチン1は、7倍増加し、MIFすなわち遊走阻止因子は4倍増加し、hrp S9 (ヒトリボソームタンパク質S9) は2.2倍増加した。

【0060】ケラチン1、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、およびヒトリボソームタンパク質S9 (hrp S9) に対するmRNAに相補的な、放射標識したcDNAを使用し、SAGEライブライアリを構成するために使用した、同じ耳介前部および耳介後部の皮膚サンプルから得たポリ (A<sup>+</sup>) RNAにおけるこれらのmRNAのレベルを決定した。コントロールのGAPDH mRNAのレベルに比べて、耳介前部および耳介後部の皮膚におけるケラチン1 mRNA、MIF mRNA、およびhrp S9のレベル (下の表A) は、本発明者らのSAGEタグ回収データと矛盾がなかった。

#### 【0061】

#### 【表3】

表A

<u>遺伝子</u>	<u>光障害を受けた肌で何倍に增加了か</u>	
	SAGE	ノーザンプロット
ケラチン1	7	4
MIF	4	2
hrp S9	2.2	1.6
G3PDH	1	1
CLSP	4	2

### 【0062】実施例2

以下の実施例は、タグの配列決定のデータを提供するSAGE分析。Velculescu他 1995に記載されている通りに、SAGE分析を行った。本質的に、2本鎖cDNAを、ビオチン化オリゴdTプライマーを使用してmRNAから合成し、次いでNla IIIで消化させた。このビオチン化3' most cDNA断片を、ストレプトアビシン磁性ビーズ(Dynal, Oslo, Norway)で分離し、2つの異なるアリコートに分けた。Bsmf I認識部位、Nla III認識部位、およびPCRプライマー結合(priming)部位を含む2つの異なるオリゴヌクレオチドリンクーを、各サンプル中のDNAに結合させた。Bsmf Iで消化させた後、タグを結合させ、ジタグ生成物をPCR増幅させ、Nla IIIで消化させることによって単離し、鎖状化し、継続的にpZeroベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)にクローニングした。組換えプラスミドを含む個々の細菌コロニーを、M13 forwardプライマーおよびM13 reverseプライマーを使用するPCRによって、インサートサイズについて調べた。次いで、最低400 bpのインサートから誘導されたPCR産物を、BigDye Terminator Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA)および310 ABI自動DNAシーケンサーを用いて配列決定した。タグをGenbank/EMBLデータベースと比較し、リンクーから誘導された重複した(duplicate)ジタグおよびタグを同定し、除外するSAGE 2000ソフトウェアプログラム(version 4.12)によって、配列を分析した。示差的に発現したmRNA由来のタグを、NCBI's SAGE map「タグから遺伝子(tag to gene)」ソフトウェアを使用してさらに分析した。

### 【0063】SAGEライブリ

1人のドナーから得た耳介前部の皮膚と耳介後部の皮膚、およびプールされた表皮のニック生検から単離したポリ(A<sup>+</sup>) RNAを用いて、3つの異なるSAGEライブリを構成した。リンクーから誘導されたタグを除くと、耳介前部の皮膚から誘導された4,830個のSAGEタグ、および耳介後部の皮膚から誘導された4,990個のタグが產生された。さらに、ヒトの表皮から誘導された5,215個のSAGEタグが产生された。これらをまとめて言うと、15,035個のタグは、

6,598個の特異的な遺伝子を表していた。

### 【0064】耳介後部の皮膚から得たSAGEタグの分析

耳介後部の皮膚から得た2,858個の特異的なタグのうち、127個のタグが少なくとも5回観察され、これらの反復性のタグの総数が、全体のタグ数の3.2%を表していた。残りの存在量が少ないタグのうち2,254個のタグは、1回のみ検出された。表IIIに、検出された50個の最も量の多い耳介後部のSAGEタグと、これらのタグの頻度、UniGeneとの信頼度の高い適合、および対応するGenBank受託番号とを列挙する。ミトコンドリアDNA由来のタグは除外した。使用できる場合は必ず、SAGEタグ配列中の15番目(CATG+11bp)を使用して、同じタグについて多重適合を区別した。2つ(タグ13とタグ33)以外のすべてのタグは、少なくとも1つの遺伝子に割り当てられた。タグ33 (ACCTCCACTG) が、UniGeneデータベースにおけるESTのクラスターにのみ割り当てられたのに対し、タグ13 (ACTTTTCAA) はどのUniGeneクラスターに対しても信頼度の高い適合をしなかった。さらに、NCBI SAGEデータベースによれば、原発性卵巣腫瘍から產生された他のSAGEライブリ中で、タグ33だけが、少ないコピー数で見られた。12個のタグが多重に割り当てられていた;これらのタグのうち5個は、2つの異なる遺伝子から誘導された配列に適合し、7個は、2個以上の異なる遺伝子由来であった。これらの量の多いタグのうち多くは、様々な細胞型において広く発現することが知られている遺伝子、特にリボソームタンパク質をコードする遺伝子、たんぱく質合成に関与する遺伝子(伸長因子1)、細胞骨格遺伝子(ラミンA/C)、およびエネルギー代謝において活性な遺伝子(グルコースリン酸イソメラーゼ)から誘導された。皮膚で特異的に発現することが知られている遺伝子から誘導されたmRNAに適合するタグも発見された。こうした皮膚に特異的な最も量の多いSAGEタグの中から、いくつかのケラチン、ならびにガレクチン7およびカルグラニュリン(calgranulin)(これらはすべて、一般に全層の皮膚に見られる)をコードするmRNAから誘導されたタグを検出した。

### 【0065】

#### 【表4】

21

22

表III：ヒト耳介後部の皮膚のSAGEライブラリから得た  
50個の最も量の多いタグ

	タグ配列	タグ数 <sup>a</sup>	受託番号 <sup>b</sup>	UniGeneとの適合 <sup>c</sup>
1	CCCGTCCGGA	63	AI291979	リボソームタンパク質L13
2	TGCACGTTT	45	X03342	リボソームタンパク質L32
3	CGCCGCCGGC	38	U12465	リボソームタンパク質L35
4	CGCTGGTTCC	34	L05092	リボソームタンパク質L11
5	GAGGGAGTTT	31	U14968	リボソームタンパク質L27a
6	GGACCACTGA	31	M90054	リボソームタンパク質L3
7	AGGCTACCGA	30	AA045770	リボソームタンパク質L13a
8	GCCCCCTGCTG	30	M21389	ケラチン5
9	GTGAAACCCC	29		多重適合
10	GGCAAGCCCC	27	AF107044/ AL022721	SRY-box21/リボソームタンパク質L10a
11	ACGCAGGGAG	23	AF187554/ AF130111	グルコースリン酸イソメラーゼ/ヒストン脱アセチル化酵素3
12	TTGGTOCTCT	23	AF026844/ NM001007	リボソームタンパク質L41/リボソームタンパク質S4
13	ACTTTTCAA	22		信頼度の高い適合なし
14	CCTGTAATCC	22		多重適合
15	CTTCCTTGCC	21	X05803	ケラチン17
16	TGTGTTGAGA	21	M27364/ L141490	伸長因子1- $\alpha$ 1/伸長因子1- $\alpha$ 1様14
17	GCAGCCATCC	20	U14969/ BC004230	リボソームタンパク質L28/ トリオースリン酸イソメラーゼ1
18	GTGGAGGGCA	20	U81233/ U62800	シスタチンE/シスタチンM
19	CACAAACGGT	19	L19739/ BC011934	リボソームタンパク質S27/精子関連抗原7
20	GATGTGCACG	19	AA583889	ケラチン14
21	GGATTGGCCT	19	M17887	リボソームタンパク質P2
22	GGGCTGGGGT	18	U10248	リボソームタンパク質L29
23	TCACCCACAC	18	AI268626	リボソームタンパク質L23

	<sup>23</sup> 24 CGCCGGAAACA	17 X73974/ BC004532	<sup>24</sup> リボソームタンパク質L4/H19、母性発現が刷り込まれた未翻訳mRNA
25	TGGTGTGAG	17 X69150	リボソームタンパク質S18
26	GCCGAGGAAAG	16 X53505	リボソームタンパク質S12
27	GTTGTGGTTA	16 AB021288	$\beta$ 2-ミクログロブリン
28	AGGTCAGGAG	15	多重適合
29	CTAACACTTC	15	信頼度の高い適合なし
30	GCCTGTATGA	15 AA324873	リボソームタンパク質S24
31	GTGAAGGCAG	15 M77234/ D14710	リボソームタンパク質S3a/ATP合 成酵素、H <sup>+</sup> 輸送、 $\alpha$ サブユニット
32	TAGGTTGTCT	15 NM03295/ AK000037	翻訳制御された腫瘍タンパク質1/ 仮想タンパク質FLJ20030
33	ACCTCCACTG	14 AA582988	ケラチノサイト分化関連タンパク 質
34	GTGGGCCACGG	14 AA128515	カルシウム結合タンパク質S100 A9
35	TAAACCTGCT	14 L07769	ガレクチン7
36	TGGGCAAAGC	14 M55409	伸長因子1- $\gamma$
37	AGCACCTCCA	13 Z11692	真核生物翻訳延伸因子2
38	GCATAATAGG	13 L38826	リボソームタンパク質L21
39	GCCGTGTCCG	13 M20020	リボソームタンパク質S6
40	TCAGATCTTT	13 M22146	リボソームタンパク質S4
41	GAAAACAAAG	12 M77663	ケラチン10
42	TTGGGCCAGGC	12	多重適合
43	AAGACAGTGG	11 X66699	リボソームタンパク質L37a
44	CCACTGCACT	11	多重適合
45	GCGAAACOCC	11	多重適合
46	GGAGGGGGCT	11 X03444	ラミンA/ラミンC
47	AAGGTGGAGG	10 L05093	リボソームタンパク質L18a
48	AATAGGTCCAA	10 M64716	リボソームタンパク質S25
49	GAACACATCCA	10 S56985	リボソームタンパク質L19
50	GCAAAACCCC	10	多重適合

a タグは、タグ数で示される通りの、存在量順に並べてある。

b 1つまたは複数の受託番号は、対応するUniGeneクラスターから誘導された代表的なESTを示す。

受託番号がない場合は、多重適合またはEST適合するタグを示している。

c UniGene Build 108から誘導された

#### 【0066】耳介前部の皮膚から得たSAGEタグの分析

耳介前部の皮膚から産生された4,830個のタグの中で、2,931個が特異的であると判明した。これらのうち127個の特異的なタグ(4%)が、5回以上出現した;タグの全体量の30%が、これらの反復性のタグ配列によって表された。すべてのタグのうちほぼ50%、すなわち2,393個が、1回だけ出現していた。表2は、耳介前部の皮膚から構成された本発明者らのSAGEライブラリにおいて検出された50個の最も量の

多いタグの一覧を示す。耳介後部の皮膚に関しては、1個のタグ(A C C T C C A C T G、耳介前部の皮膚におけるタグ22、耳介後部の皮膚におけるタグ33)を除くすべてが、少なくとも1個の遺伝子に適合し、複数のタグは、1個を超える遺伝子に割り当てることができた。最も量の多い耳介前部の皮膚タグのほとんどすべてが、耳介後部の皮膚においてコピー数が多いことも判明した。タグ28(A T C C G C G A G G C、カルモジュリン様皮膚タンパク質)を除いて、50個の最も量の多い耳介前部タグのリスト中のすべてのタグは、耳介後部

における50個の最も量の多いタグの中にあると判明した、あるいはほぼ同じタグ数で検出された。耳介前部の皮膚における最も量の多いタグの大部分は、ハウスキーピング遺伝子によってコードされるmRNAから誘導されたものであり、他の組織を用いた以前のSAGE研究

究(Chen他、1998; Velculescu他、1997)と矛盾しなかった。

## 【0067】

## 【表5】

表IV：ヒト耳介前部のSAGEライブラリから得た50個の最も量の多いタグ

	タグ配列	タグ 数 <sup>a</sup>	受託番号 <sup>b</sup>	UniGeneとの適合 <sup>c</sup>
1	CCCGTCCGGA	50	AA010823	リボソームタンパク質L13
2	TAAACCTGCT	40	L07769	ガレクチン7
3	CGCCGCCGGC	34	U12465	リボソームタンパク質L35
4	GTGAAACCCC	34		多重適合
5	GATGTGCACG	26	AA583889	ケラチン14
6	TTGGTCCTCT	26	AF026844/ NM001007	リボソームタンパク質L41/リボソームタンパク質S4
7	GCCCCCTGCTG	25	M19723	ケラチン5
8	GCAGGCCATCC	24	U14969/ BC004230	リボソームタンパク質L28/トリオースリン酸イソメラーゼ1
9	TGTGTTGAGA	24	M27364/ L141490	伸長因子1- $\alpha$ 1/伸長因子1- $\alpha$ 1様14
10	ACGCAGGGAG	23	AF187554/ AF130111	グルコースリン酸イソメラーゼ/ ヒストン脱アセチル化酵素3
11	GAAAACAAAG	23	J04029	ケラチン10
12	TGCACGTTTT	23	X03342	リボソームタンパク質L32
13	AGGCTACGGA	21	AA045770	リボソームタンパク質L13a
14	CGCTGGTTCC	21	L05092	リボソームタンパク質L11
15	GCCGAGGAAG	21	X53505/ AK025643	リボソームタンパク質S12/仮想タンパク質
16	GGCAAGCCCC	21	AF107044/ AL022721	SRY-box21/リボソームタンパク質L10a
17	CCTGTAATCC	20		多重適合
18	GAGGGAGTTT	20	U14968	リボソームタンパク質L27a
19	GGGCTGGGGT	20	U10248/ BC011934	リボソームタンパク質L29/精子関連抗原7
20	GTGGAGGGCA	19	U81233/ U62800	シスタチンE/シスタチンM
21	TGGTGTTGAG	19	X69150	リボソームタンパク質S18
22	ACCTCCACTG	18	AA582988	ラットケラチノサイト分化関連タンパク質おそらく類似(lkely ortholog)

	27		28
23	GCCGTGTCCG	18	M20020 リボソームタンパク質S6
24	CGCCGGAACA	17	X73974/ BC004532 リボソームタンパク質L4/H19、母性発現が刷り込まれた未翻訳mRNA
25	GGACCACCTGA	17	X73460 リボソームタンパク質L3
26	TGGGCAAAGC	17	M55409 伸長因子1- $\gamma$
27	AGGTCAAGGAG	16	多重適合
28	ATCCGCGAGGC	16	Af172852 カルモジュリン様皮膚タンパク質
29	GGATTTGGCC	16	M17887 リボソームタンパク質P2
30	CTAAGACTTC	15	信頼度の高い適合なし
31	AAGGTGGAGGA	14	AB007175 リボソームタンパク質L18a
32	GTGCCAACGG	14	M26311 S100カルシウム結合タンパク質A9
33	AAAAAAAAAA	13	多重適合
34	CTTCCTTGCC	13	X05803 ケラチン17
35	GCATAATAGG	13	U14967 リボソームタンパク質L21
36	TCACCCCACAC	13	AI268626 リボソームタンパク質L23
37	TTCAATAAAA	13	M17886/ AK025203 リボソームタンパク質P1/ FLJ21550fs、クローンCOL06258
38	CACAAACGGT	12	L19739 リボソームタンパク質S27
39	CCACTGCACT	12	多重適合
40	CCCATCCGAA	11	L07282 リボソームタンパク質L26
41	GTGAAACCCCT	11	多重適合
42	GTTGTGGTTA	11	AB021288 $\beta$ 2-ミクログロブリン
43	AAGGAGATGG	10	X15940 リボソームタンパク質L31
44	AGAAAAAAA	10	AB024057/ X15940 血管のRab-GAP (TBC含有)/ リボソームタンパク質L31
45	CTGGGTTAAT	10	M81757 リボソームタンパク質S19
46	GACGACACGA	10	L05091 リボソームタンパク質S28
47	AGGCTCCTGGC	9	AF106911 小分子誘導 (small inducible) サイトカインサブファミリーBのメンバー-14 (BRAK)
48	ATGGCTGGTAT	9	X17206 リボソームタンパク質S2
49	CCAGTGGCCCG	9	U14971 リボソームタンパク質S9
50	CTCCTGGCGC	9	M58026 カルモジュリン様3

a、b、cは、表IIに対する説明で述べた通りである。

#### 【0068】表皮から得たSAGEタグの分析

5,215個のSAGEタグを、表皮のニック生検から生成し、これは2,982個の特異的な遺伝子に相当した。このライプラリにおけるタグ分布は、耳介前部および耳介後部の皮膚ライプラリから得られたSAGEライプラリで観察された分布とほぼ同じであった。表皮のライプラリ中で最も量の多いタグ（5個以上のタグ）は、特異的なタグの4%に相当した。単一のタグは、特異的なタグの80%およびこのSAGEライプラリに存在するすべてのタグの45%に相当した。50個の最も頻度の高い表皮のタグを、表Vに列挙する。これらの50個のタグのうち、2個は、UniGeneデータベースと比較したときいずれの遺伝子適合も示さず、3個のタグ

は、UniGene EST クラスターに割り当てられただけであり、14個のタグ（28%）は、単一の遺伝子に属さなかった。7個の最も高度に発現した遺伝子のうち、4個の異なるケラチン（ケラチン1、10、5、および14）が、一般に、表皮のケラチノサイトで発現することが判明した。中間径フィラメントタンパク質のケラチン5および14の遺伝子が、表皮の基底層で高度に発現することが知られているのに対し、ケラチン1および10は、主に、表皮の基底上皮（suprabasal layer）の分化しているケラチノサイトに見られた。ケラチンを架橋するフィラグリン、および同様に中間径フィラメントの架橋体（cross-linker）であるプラコグロブリン、および接着斑の高密

度ブラークをコードするmRNAから得たタグも、50個の最も量の多いタグの中にあった。この表中のこれら  
のタグの残りは、多くの異なる組織で発現することが知られた遺伝子から広く誘導されている。

【0069】

【表6】

表V：ヒト表皮のSAGEライブラリから得た50個の最も量の多いタグ

	タグ配列	タグ数 <sup>a</sup>	受託番号 <sup>b</sup>	UniGeneとの適合 <sup>c</sup>
1	GAAAACAAAG	77	M77663	ケラチン10
2	CCCGTCCGGA	66	AA010823	リボソームタンパク質L13
3	GOCCCCTGCTG	52	M21389	ケラチン5
4	GATGTGCACG	48	AA583889	ケラチン14
5	ACTTTTCAGA	42		信頼度の高い適合なし
6	ACAGCGGCAA	40	M77830	デスマグラキン1
7	ACATTTCAAAG	39	AA024512	ケラチン1
8	CGCCGCCGGC	39	U12465	リボソームタンパク質L35
9	TAAACCTGCT	39	L07739	ガレクチン7
10	GGATTTGGCCT	33	M17887	リボソームタンパク質P2
11	GTGAAACCCC	33		多重適合
12	GTTGTGGTTAA	32	AB021288	$\beta$ 2-ミクログロブリン
13	GGGCTGGGGTC	30	U10248/ AF047437	リボソームタンパク質L29/精子関連抗原7
14	ACCTCCACTGG	25	AA582988	ケラチノサイト分化関連タンパク質
15	CCACAGGAGAA	25	AJ251830	p53誘発タンパク質PIGPC1
16	ATCCGCGAGGC	24	AJ172852	カルモジュリン様皮膚タンパク質
17	CCTGTAATCC	23		多重適合
18	GCAGCCATCCG	21	U14969/ BC004230	リボソームタンパク質L28/トリオースリン酸イソメラーゼ1
19	GGACCACTGAA	20	M90054	リボソームタンパク質L3
20	TGTGTTGAGA	20	M27364/ L141490	伸長因子1- $\alpha$ 1/伸長因子1- $\alpha$ 1様14
21	AGAAAAAAAAAA	19		多重適合
22	CGCTGGTTCC	19	L05092	リボソームタンパク質L11
23	GAGGGAGTTTC	19	U14968	リボソームタンパク質L27a
24	GGCGCGTTCG	19	M13932	リボソームタンパク質S17
25	GCCGAGGAAG	18	X53505/ AK025643	リボソームタンパク質S12/仮想タンパク質

				31
26	GTGTGGGGGC	18	Z68228	プラコグロビン
27	AAGGTGGAGGA	17	L05093	リボソームタンパク質L18a
28	GAGAGCTAACT	17	M60502	フィラグリン
29	GCCGTGTCG	17	M20020	リボソームタンパク質S6
30	GGCAAGCCCCA	17	AF107044/ AL022721	SRY-box21/リボソームタンパク質L10a
31	ATGGCTGGTAT	16	AL031671	リボソームタンパク質S2
32	GCCTTCTGGAT	16	AA733153	タンパク質ホスファターゼ2
33	AAAAAAAAAA	15		多重適合
34	CAGGTTTCATA	15	AF106911	小分子誘導 (small inducible) サイトカインサブファミリーBのメンバー-14 (RAK)
35	CCACTGCACT	13		多重適合
36	CCAGAACAGAC	15	L05095/ L16991	リボソームタンパク質L30/デオキシチミジレート (deoxythymidylate) キナーゼ
37	TTCAATAAAA	15		多重適合
38	ATTGAGAAGC	14		信頼度の高い適合なし
39	TTGGTCTCTG	14	AF026844/ NM001007	リボソームタンパク質L41/ribosomalタンパク質S4
40	AGGCTCCTGGC	13	AF106911	小分子誘導 (small inducible) サイトカインサブファミリーBのメンバー-14 (RAK)
41	TAGGTTGTCTA	13	NM03295/ AK000037	翻訳制御された腫瘍タンパク質1/仮想タンパク質FLJ20030
42	GGAGGCTGAGG	12		多重適合
43	AATCTTGTCT	11	BC004493	仮想遺伝子ZD52F10
44	ACCTGGAGGGG	11		EST
45	ATAATTCTTT	11	AK021540/ AA147325	cDNA FLJ11778fis、クローン HEMBA1005911/リボソームタンパク質S29
46	CTGGGTTAAT	11	M81757	リボソームタンパク質S19
47	CCAGTGGCCC	10	AI064904	リボソームタンパク質S9
48	GCGAAACCCC	10		多重適合
49	TCAGATCTTT	10	M22146	リボソームタンパク質S4
50	ACGCAGGGAG	9	AF187554/ AF130111	グルコースリン酸イソメラーゼ/ヒストン脱アセチル化酵素 3

32

a、b、cは、表I.I.Iに対する説明で述べた通りである。

## 【0070】実施例3

ヒトの皮膚におけるmRNAプロファイルのこのSAGE分析では、15,000個以上のタグが同定され、これは6,500個以上の異なる遺伝子からのmRNAに相当していた。選択的な顔面形成術を受けていた、日光による障害を患有患者から得られた、慢性的に日光に曝された耳介前部の皮膚および日光から保護された耳介後部の皮膚から単離されたポリ(A<sup>+</sup>)RNA中で、全層の皮膚におけるこれらのmRNAが同定された。耳介前部および耳介後部の皮膚のこのモデルを選択することによって、日光性弾力線維症を研究するためのマウスの固有の問題点を含めて、少なくとも他のモデルシステムの

制限のいくつかが回避された。日光に曝されたヒトの皮膚を使用することにより、太陽光の異なる成分の影響を識別するのではなく、自然の太陽光の影響を研究することも可能になった。Brown他 (Brown他、2000) による最近の研究は、例えば、普通の蛍光太陽灯 (fluorescent sunlamp) は、自然の太陽光の代わりに用いるには不適当であることを報告している。さらに、細胞培養モデルは、例えば、細胞型間の相互作用を無視することなどの結果、異なる細胞型、ならびに組織の三次元構造を十分に表すことはめったらない。さらに、本研究における皮膚の生検は、皮膚における体の異なる部位との表現型の違いを最小限にす

る試みで、顔の近接する部位から採取された。しかし、耳介前部と耳介後部のヒトの皮膚を使用すると、日光への曝露の合計時間などの実験条件を制御したり、同実験条件に影響を与える可能性が制限される。さらに、本発明者らのモデルは、制御および制限された、UV光線への曝露によって引き起こされる変化を表すのではなく、長年の日光への曝露によるmRNAの定常状態レベルの変化を反映することが分かっている。

【0071】全層のヒトの皮膚は、様々な異なる細胞集団を含んでいるが、ヒトの皮膚において最も量の多い細胞型は、表皮から誘導されたケラチノサイトである。したがって、全層の皮膚から得られたmRNAプロファイルは、広くケラチノサイトから誘導されたmRNAのスペクトルを反映することが予想され、実際にこの結果が得られた。耳介前部の皮膚と耳介後部の皮膚の両方における、50個の最も量の多いmRNAを、表皮のニック生検から得られたSAGEライブリ中で同定されたmRNAプロファイルと比較すると、これらのタグの多くが、表皮に一般に見られるタンパク質をコードするmRNAから誘導されていることが明白である。これらの例には、ケラチン、ガレクチン7、カルモジュリン様皮膚タンパク質がある。

【0072】ヒトの皮膚線維芽細胞のSAGEライブリ（データは示していない）から得られたタグの同様の分析により、皮膚の線維芽細胞において最も量の多いものの中にあると予想されるいくつかのmRNAが現れた。これらのmRNAには、プロ $\alpha$ 1(I)、プロ $\alpha$ 2(I)、およびプロ $\alpha$ 1(III)コラーゲン、ならびにいくつかのマトリックスメタロプロテイナーゼをコードするmRNAが含まれる。これらのmRNAから誘導されたタグは、本発明者らの全層の皮膚ライブルリ中では観察されず、このことは、全層の皮膚のこのSAGE分析で観察された量の多いmRNAの大部分が、表皮のケラチノサイトから誘導されたという結論を支えていた。

【0073】表IおよびIIに、耳介前部と耳介後部の皮膚の間で存在量が増加または減少した34個の異なる遺伝子から誘導されたタグを列挙する。このタグ数の変化は、これらのタグが誘導されたmRNAについての定常状態レベルの変化を直接反映するものであり、遺伝子発現の変化を間接的に反映する。この根元的な仮定は、mRNAレベルの変化が、そのmRNAがコードするタンパク質の量の変化に反映されるということである。

【0074】耳介前部と耳介後部の皮膚の間で存在量が少なくとも4倍異なることによって表される34個の異なるmRNAのうち、6個のmRNAはリボソームタンパク質をコードし、2個のmRNAは翻訳開始因子タンパク質をコードしている。この研究では、リボソームタンパク質と開始因子タンパク質のmRNAのこうした変化が、日光への慢性的曝露に関連するタンパク質合成に

おける全般的な変化を反映すると想定される。リボソームタンパク質をコードするmRNAから誘導されたタグは、たいていのSAGE研究において普通に存在するので、たいていの著者は、これらのタグの出現に特別な機能的重要性を置いていない。

【0075】表IおよびII中の4個のタグは、多重適合していることが示された。これらのタグのうち3個は、ポリ(A)のストレッチに対応する。SAGEタグは、mRNAの3'端から構成されるので、これらのポリ(A)配列は、ほぼ確実に、1つまたは複数のmRNAの3'未翻訳領域(UTR)内のポリ(A)のストレッチ、あるいはmRNAの3'UTRの3'端に転写後に付加されたポリ(A)テールに相当する。どちらの例でも、たいていのmRNA中のこれらの共通の配列に対するタグ適合により、これらのタグが誘導されたmRNAのより的確な同定が妨げられる。同様に、仮想タンパク質(hypothetical protein)(AF151075)と同定された、表II中のタグについてのUniGeneとの適合は、以前に同定された、機能の知られていないESTクラスターを表す。タンパク質AAB542440を合成すると予測されるmRNAに対して相同性が限定されたESTもまた、機能が知られていないタンパク質をコードするESTである。表I中の、GenBank中で同定されなかった2個のタグは、以前にESTと同定されなかったmRNAに相当する。

【0076】18個の異なるmRNAをコードする残りのタグについて、これらのmRNAがコードするタンパク質が、主に表皮に限られる機能的に異なるグループのタンパク質に相当することは、印象的である。まとめて考えると、これらの変化は、皮膚、特に表皮のUV照射への慢性的曝露に対する、MIFのレベルの上昇によって示されるような持続的な炎症反応を含めた防御機構を示唆する。さらに、IGFBP-6、CLSP、およびEFABP（どれもケラチノサイト分化に関係する）は、mRNAの定常状態レベルの上昇を示し、さらに、Bcl-2アンタゴニストおよびBaxインヒビター1による、アポトーシス抑制のレベルの上昇は、日光により障害を受けた肌におけるケラチノサイト増殖-分化サイクルの変化を意味する。さらに、Ca<sup>2+</sup>レベルは、ケラチノサイトにおけるこのサイクルのスイッチにとつて重要な因子であることが知られているので、日光により障害を受けた肌において、いくつかのCa<sup>2+</sup>結合タンパク質をコードするmRNAレベルも変化することは意外ではない。

【0077】本明細書で説明する耳介前部および耳介後部のSAGEライブルリは、そのとき選択的な顔面形成術を受けている55歳の女性のドナーから得られた皮膚サンプルから構成した。したがって、この耳介前部の皮膚サンプルは、数十年間繰り返し日光への曝露を受けた

皮膚を表していた。日光への慢性的かつ繰り返しの曝露の合成的結果に取り組んだ研究はこれまでほとんどなかった。例えば、Voorhees他は、繰り返し日光に曝される間の真皮の結合組織のコラーゲンおよび他の成分の異常なリモデリングのための根元的機構としての、マトリックスメタロプロテイナーゼの、UVにより誘発され、MAPキナーゼが仲介する活性化という魅力的な仮説を提案している。

【0078】概要を述べると、本発明に関する実施されるSAGE分析は、日光への慢性的曝露に伴うヒトの全層の皮膚における合成的变化の包括的なプロファイルを得るための初めての試みである。分析された特異的な6,500個の転写産物の全体から、日光への慢性的曝露に伴って定常状態レベルがかなり変化した18個の異

なるmRNAが同定された。

【0079】本発明を、多少具体的に、そのある種の好ましい実施形態について、本明細書で説明してきたが、これまで説明してきた本発明の範囲および趣旨に含まれる、実施可能なその多数の変形形態、修正形態、および代替形態は、当分野の技術者には理解されるであろう。これらの修正形態および変形形態はすべて、本明細書で説明および主張した通りの本発明の範囲内であり、本発明は頭記の特許請求の範囲によってのみ限定され、こうした特許請求の範囲は適度に広く解釈されるものとする。この出願全体を通して、様々な刊行物を引用してきた。これらのそれぞれの刊行物の全体を、参照によって本明細書に組み込む。

---

#### フロントページの続き

(72)発明者 カート・マシュー・シリング  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・  
07020、エツジウォーター、リバー・ロー  
ド・45、ユニリーバー・リサーチ・ユー  
ース・インコーポレイテッド

(72)発明者 チャールズ・ボイド  
アメリカ合衆国、ハワイ・96822、ホノル  
ル、スイート・280、ウッドローン・ドラ  
イブ・2800、ユニバーシティ・オブ・ハワ  
イ

(72)発明者 ヨハン・ウーアシツツ  
アメリカ合衆国、ハワイ・96822、ホノル  
ル、スイート・280、ウッドローン・ドラ  
イブ・2800、ユニバーシティ・オブ・ハワ  
イ

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA12 HA12  
4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ53 QR08  
QR42 QR56 QS25 OS34 QX02